·论　著·

医院分离耐碳青霉烯类药物鲍曼不动杆菌亲缘性的研究*

李光荣，向成玉，杨　葵，刘靳波△
（泸州医学院附属医院检验科，四川泸州 646000）

摘　要：目的　通过分析鲍曼不动杆菌（Ab）碳青霉烯类药物耐药和敏感菌株蛋白指纹图谱，了解碳青霉烯类药物耐药菌株亲缘性远近的临床应用价值。**方法**　收集临床分离对碳青霉烯类药物耐药（22 株）和敏感的 Ab（18 株），利用表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术（SELDI-TOF-MS）检测细菌蛋白质指纹图谱。采用 Biomarker Wizard 3.1 软件分析碳青霉烯类药物耐药和敏感 Ab 相关差异蛋白，采用 SPSS 19.0 对差异蛋白进行聚类分析，追溯其临床感染的亲缘性。**结果**　碳青霉烯类药物耐药与敏感的 Ab 菌株间蛋白质谱的表达差异有统计学意义（$P<0.05$）。聚类分析结果显示碳青霉烯类药物耐药 Ab 在院内的分布以 A 型为主，B 型次之。**结论**　聚类分析碳青霉烯类抗菌药物耐药的 Ab 蛋白质谱结果能够判断细菌亲缘关系远近，可为 Ab 感染和临床流行病学调查提供理论依据。

关键词：鲍曼不动杆菌；　表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术；　聚类分析；　蛋白组学
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.009　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2016)06-0740-03

The research on affinity of hospital separation carbapenems-resistant Acinetobacter*

Li Guangrong, Xiang Chengyu, Yang Kui, Liu Jinbo△
(*Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan* 646000, *China*)

Abstract: Objective　To study the protein fingerprinting of carbapenems resistant and susceptible Acinetobacter baumannii (Ab) strains, investigate the clinical value of affinity distance in carbapenems resistant strains. **Methods**　A total of 22 carbapenems resistant Ab strains and 18 carbapenems susceptible Ab strains were collected, and bacterial protein fingerprinting was detected by surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS), differentially expressed proteins was analyzed by Biomarker Wizard 3.1. Cluster analysis of differential expressed proteins was conducted on SPSS 19.0. **Results**　The protein expression pattern of carbapenems resistant and sensitive Ab strains had significant difference ($P<0.05$). Cluster analysis showed carbapenems resistance Ab was given priority to with type A, followed by type B. **Conclusion**　The results of cluster analysis carbapenems resistance of Ab protein fingerprinting could determine the distance of affinity relationship of Ab. It could provide a theoretical basis for the infection and clinical epidemiology of Ab.

Key words: Acinetobacter baumannii;　surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry;　cluster analysis;　proteomics

鲍曼不动杆菌（Ab）大量存在于医疗环境中，常常可导致严重的院内感染，根据 2013 年 CHINET 数据显示，Ab 的临床分离率已高于铜绿假单胞菌，位居非发酵菌临床分离率第一位[1]。碳青霉烯类药物是 β-内酰胺类抗菌药物。近年来关于 Ab 耐碳青霉烯类抗菌药物的报道越来越多，患者一旦感染对碳青霉烯类药物耐药的 Ab，常规抗菌药物基本治疗无效，患者往往死于无药可选[2]，因而如何治疗对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 Ab 感染已经成为一个棘手的问题。随着表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术（SELDI-TOF-MS）的广泛应用，蛋白组学在细菌耐药机制方面的应用也越来越多。本研究采用 SELDI-TOF-MS 技术检测对碳青霉烯类药物耐药的 Ab 株蛋白质表达谱，寻找碳青霉烯类药物耐药和敏感菌株之间的微量差异蛋白，通过对耐药菌株蛋白质指纹图谱进行聚类分析，探讨蛋白质组学在 Ab 亲缘性方面的价值，为院内 Ab 的感染和流行病学调查提供合理的依据。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　收集 2011 年 1 月至 2013 年 4 月本院临床分离的 Ab 40 株，剔除同一患者同一部位分离的菌株，其中碳青霉烯类药物耐药和敏感菌株分别为 22 株和 18 株。

1.2　仪器与试剂　MicroScan WalkAway 96 全自动微生物鉴定/药敏测试系统及其配套试剂（德国西门子公司），蛋白芯片时间质谱仪（PBS Ⅱ C）（Ciphergen Biosystems Inc），Au 芯片（美国 Bio-Rad 公司），低温台式高速离心机（5415D）（德国 Eppendof 公司），芥子酸（美国 Bio-Rad 公司），三氟乙酸、甲酸、胰岛素（美国 Sigma 公司），亚胺培南和美罗培南药敏纸片（Oxoid 公司）。

1.3　方法

1.3.1　细菌鉴定和药敏试验　全部 Ab 均通过菌落形态，革兰染色后镜下形状及 MicroScan WalkAway96 全自动微生物鉴定/药敏测试系统获得。用亚胺培南、美罗培南药敏纸片对经仪器鉴定为亚胺培南耐药的 Ab 采用纸片扩散法（K-B 法）进行验证。试验操作及药敏结果参照 2010 年美国临床和实验室标准化协会（CLSI）标准执行。所有 Ab 经检测鉴定后冻存于－80 ℃冰箱。药敏试验所用质控菌株为：大肠埃希菌 ATCC25922、AbATCC19606。所有 Ab 菌株经鉴定后保存于－80 ℃冰箱。

*　基金项目：泸州医学院附属医院基金资助项目（14035）。　作者简介：李光荣，男，主管技师，主要从事微生物与生物化学检验研究。　△　通讯作者，E-mail：liujb7203@163.com。

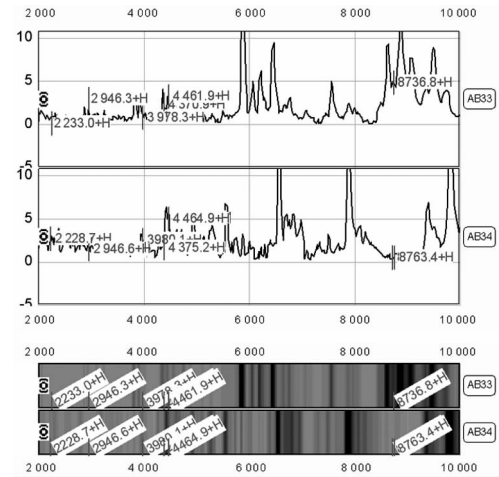
1.3.2 细菌复苏与蛋白质提取　将－80 ℃保存的 40 株 Ab 菌株常温下放置 30 min 后接种于巧克力平板，6.5% CO_2，35 ℃，培养 16～24 h 分离出纯菌落。蛋白质的提取采用有机溶剂沉淀提取法，在低温下(4 ℃)进行操作[3-5]。

1.3.3 质谱检测与分析　严格按照 PBS Ⅱ C 型蛋白指纹图谱仪操作规程进行操作，经过样品混合液的制备、芯片活化和点样三个步骤。设置仪器运行条件：开始检测相对分子质量为 $1\,000\times10^3$；检测最高限为 $100\,000\times10^3$，优化限为 $2\,000\times10^3$～$20\,000\times10^3$；开始激光强度为 200；开始检测灵敏度为 8；对结合在芯片表面的细菌蛋白质进行检测，质谱检测采用标准蛋白对照液(胰岛素，5 733.58)，二维内标法进行质量控制[6]。使用 Ciphergen Protein Chip 软件对蛋白质质谱数据进行分析，以质荷比((M/Z)为横坐标，以波峰强度(蛋白质相对浓度)为纵坐标绘制质谱图。BioMarker Wizard Software 计算碳青霉烯类耐药和敏感菌株的蛋白质相对浓度，两组蛋白质峰值间比较采用 t 检验，筛选出差异蛋白($P<0.05$)。

1.4 统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件进行聚类分析，根据数据特点选择离差平方和聚类法(也称 Ward 聚类法)。

2 结　果

2.1 Ab 蛋白质指纹图谱　通过 PBS Ⅱ C 型蛋白指纹图谱仪检测结合在 Au 芯片上的 Ab 蛋白质，获得 22 株对碳青霉烯类药物耐药和 18 株对碳青霉烯类药物敏感的菌株，Ab 蛋白质指纹图见图 1。碳青霉烯类药物耐药与敏感菌株蛋白质比较，24 个蛋白质峰差异有统计学意义($P<0.05$)，从其中筛选质荷比分别为 2 233.0、2 946.3、3 978.3、4 376.9、4 461.9、8 736.8 的蛋白质进行聚类分析，见表 1。



横轴：质荷比 AB33，碳青霉烯类药物耐药菌株；纵轴：峰强度 AB34，碳青霉烯类药物敏感菌株。

图 1　碳青霉烯类药物耐药与敏感 Ab 菌株蛋白指纹图谱

表 1　用于聚类分析的差异蛋白质

M/Z	P	MEAN-R	SD-R	MEAN-S	SD-S
2 233.043 523	0.002 765	0.511 288	1.219 833	1.432 502	0.776 767
2 946.333 022	0.033 496	3.826 697	3.907 323	4.745 153	2.135 548
3 978.316 992	0.033 496	1.952 410	1.407 704	1.100 621	0.911 560
4 376.938 972	0.029 238	1.428 866	0.815 687	2.262 334	1.214 679
4 461.906 342	0.027 290	2.648 189	1.508 827	4.209 704	2.144 374
8 736.830 742	0.023 728	4.580 948	3.258 430	6.731 661	3.002 286

MEAN：均值；SD：标准差；M/Z：质荷比；R：碳青霉烯类药物耐药菌组；S：碳青霉烯类药物耐敏感组。

表 2　22 株 Ab 聚类分析

阶	群集组合		系数	首次出现阶群集		下一阶
	群集 1	群集 2		群集 1	群集 2	
1	11	18	1.648	0	0	10
2	8	19	3.589	0	0	13
3	7	13	5.766	0	0	17
4	9	22	7.952	0	0	5
5	9	17	11.332	4	0	6
6	1	9	14.990	0	5	11
7	2	5	18.937	0	0	13
8	4	21	23.316	0	0	10
9	12	16	29.191	0	0	15
10	4	11	35.842	8	1	16
11	1	10	43.680	6	0	14
12	6	14	53.691	0	0	20
13	2	8	63.747	7	2	17

续表 2　22 株 Ab 聚类分析

阶	群集组合		系数	首次出现阶群集		下一阶
	群集 1	群集 2		群集 1	群集 2	
14	1	15	75.021	11	0	16
15	12	20	92.056	9	0	18
16	1	4	113.462	14	10	19
17	2	7	137.310	13	3	19
18	3	12	170.650	0	15	20
19	1	2	227.519	16	17	21
20	3	6	290.921	18	12	21
21	1	3	537.611	19	20	0

2.2 聚类分析结果　22 株碳青霉烯类药物耐药的 Ab 聚类分析见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。横轴为标本之间的差异水平，纵轴代表聚类的标本。在差异水平值(欧氏距离)为 10 时，聚类分析结果将 22 株碳青霉烯类药物耐药的 Ab 分成 A 型、B 型，从图 2 中可以看出碳青霉烯类药物耐药的 Ab 分布以 A 型为主，B 型次之。A 型又分为 A1、A2

两个亚型，并以 A1 为主，B 型也分为 B1、B2 两个亚型，并以 B2 为主。22 株 Ab 聚类分析见表 2。

3 讨 论

近年来，在微生物研究方面用 SELDI-TOF-MS 蛋白芯片技术已获得越来越多有意义的成果。通过比较待测微生物和其他微生物的蛋白指纹图谱，可以找到待测微生物的特异蛋白，通过比较某种细菌耐药和敏感菌株的蛋白指纹图谱可以分析该种细菌对某种药物产生耐药的蛋白质组学原因。解春宝等[7]通过 SELDI-TOF-MS 技术建立铜绿假单胞菌蛋白指纹图谱诊断模型，快速鉴定铜绿假单胞菌。黄文芳等[8]通过 SELDI-TOF-MS 技术为血流感染病原菌的快速鉴定提供了新思路。

余琳等[9]对分离自呼吸重症监护病房(RICU)的多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)基因同源性进行流行病学分析，发现 MDRAB 曾在 RICU 有小范围的爆发流行。本研究采用 SELDI-TOF-MS 技术分析碳青霉烯类药物敏感与耐药 Ab 的蛋白表达，结果显示在相对分子质量为 $2\ 000\times10^3$～$20\ 000\times10^3$ 范围内的蛋白质峰中有 24 个差异具有统计学意义($P<0.05$)。将差异蛋白经过聚类分析显示碳青霉烯类药物耐药的 Ab 分布以 A 型为主，B 型次之，A 型分为 A1 和 A2 两个亚型，并以 A1 为主，B 型也分为 B1、B2。从聚类表中看到 11 和 18 号标本系数最小，距离最近，蛋白质数据最接近，被同时归为 A1 型，经查阅患者原始资料后发现 2 株 Ab 是在同一个月从同一科室患者痰液标本分离而得，说明 2 株 Ab 间亲缘最近，有可能来源于同一株 Ab。8 号和 19 号标本系数仅次于 11 和 18 号标本，蛋白质数据也很接近，聚类分析也被同时归为 A2 型，查阅患者原始资料，也是在同一个月从同一科室患者痰液标本分离而得，说明两次分离所得的细菌也可能来源于同一株 Ab。以上结果说明，本院临床分离 Ab 曾在小范围内发生爆发流行，临床医生可通过本研究尽早了解本科室感染患者的互相感染，并采取措施预防和控制碳青霉烯类耐药菌株的流行。

本研究利用 SELDI-TOF-MS 技术初步筛选了碳青霉烯类药物敏感和耐药的 Ab 差异蛋白，但能否将此差异蛋白分离、纯化及鉴定，然后作为 Ab 碳青霉烯类药物耐药和敏感的蛋白标志物，用于临床的诊断与鉴别诊断的可行性尚需进一步研究。虽然本试验只是一个初步研究，但为 Ab 碳青霉烯类药物耐药和敏感菌株的诊断与鉴别诊断方面的研究提供了新的方法和思路。

综上所述，聚类分析碳青霉烯类抗菌药物耐药的 Ab 蛋白质谱结果能够判断细菌亲缘关系远近，可为 Ab 感染和临床流行病学调查提供理论依据。

参考文献

[1] 胡付品，朱德妹，汪复，等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2014，14(5)：365-374.

[2] Manikal VM，Landman D，Saurina G，et al. Endemic carbapenem-resistant Acinetobacter species in Brooklyn，New York：citywide prevalence，interinstitutional spread，and relation to antibiotic usage[J]. Clin Infect Dis，2000，31(1)：101-106.

[3] Vanlaere E，Sergeant K，Dawyndt P，et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of Burkholderia cepacia complex [J]. J Microbiol Methods，2008，75(2)：279-286.

[4] 范铁男，邹积宏，卢行安，等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术用于常见益生菌鉴定的初步研究[J]. 中国微生态学杂志，2010，22(10)：868-875.

[5] 徐昕荣，朱斌，马瑜璐，等. MALDI-TOF-MS 鉴定生物脱氮细菌的方法研究[J]. 环境科学与技术，2010，33(10)：148-161.

[6] 丁银环，胡琼英，梁双花. 运用内标校准法提高表面增强激光解吸电离飞行时间质谱检测中的重复性[J]. 中华检验医学杂志，2009，32(3)：337-339.

[7] 解春宝，肖代雯，杨永长，等. 利用 Au 蛋白芯片技术快速鉴定铜绿假单胞菌的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2011，31(5)：462-466.

[8] 黄文芳，肖代雯，杨永长，等. 引起血流感染常见的革兰氏阴性杆菌蛋白指纹图谱的建立[J]. 实用医院临床杂志，2012，9(3)：33-36.

[9] 余琳，苏丹虹，江凤茹，等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因分析与同源性分析[J]. 实用医学杂志，2013，42(12)：2018-2021.

(收稿日期：2015-12-28)

(上接第 739 页)

[3] Pichler M，Calin GA. MicroRNAs in cancer：from developmental genes in worms to their clinical application in patients[J]. British J Cancer，2015，113(4)：569-573.

[4] 傅敏根，李硕，郁婷婷，等. miR-195 在食管癌中的表达及其对食管癌细胞株增殖的影响[J]. 南京医科大学学报：自然科学版，2013，33(5)：575-578.

[5] 向正凯，严宝国. 食管癌组织中 microRNA-21 的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究，2014，41(8)：902-905.

[6] 蒋敏，顾国浩，张静，等. 食管癌患者外周血单个核细胞中 miR-21 的表达[J]. 中国现代医学杂志，2013，23(4)：34-38.

[7] 孟宪琴，刘庚勋. miRNA 在消化管癌中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(19)：2223-2225.

[8] 管晓翠. 血清 microRNA 作为食管鳞状细胞癌诊断及手术疗效评价指标的研究[D]. 南京：南京师范大学，2013.

[9] 于万涛，王朝霞. miR-100 与肿瘤关系的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志，2014，19(8)：747-751.

[10] Sun J，Chen Z，Tan X，et al. MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Med Onco，2013，30(1)：411-420.

(收稿日期：2015-12-20)